Aus dem pathologischen Institut.

Lane Medical Library

Ueber

Abschwächung pathogener Schimmelpilze.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

bei der hohen medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität zu Bonn

eingereicht

am 16. August 1888

von

Otto Hügemeyer

aus München-Gladbach.

Bonn,

Druck von J. F. Carthaus.

Seinen Eltern

in Liebe und Dankbarkeit

gewidmet.

Die Erfolge, die mit der Abschwächung pathogener Spaltpilze erzielt wurden, liessen daran denken, ob Aehnliches nicht auch mit den leichter zu beobachtenden und experimentell bequemer zu prüfenden Schimmelpilzen möglich sei. Nachdem die bisherigen nach dieser Richtung angestellten Versuche ohne Resultat geblieben waren, wurde Herr Professor Ribbert durch gelegentliche Beobachtungen bewogen, die Frage einer erneuten Prüfung zu unterziehen. Er veranlasste mich die erforderlichen Versuche anzustellen. Bevor ich die Ergebnisse mittheile, gebe ich eine Uebersicht über die bisherigen Untersuchungen.

Zuerst stellte Grawitz seine sehr bekannt gewordenen Versuche an. Obgleich sich dieselben mittlerweile als nicht zutreffend erwiesen haben, führe ich sie doch in kurzer Uebersicht an, um alle Methoden zusammenzufassen, die man bisher zur Abschwächung pathogener Schimmelpilzformen in Anwendung gebracht hat.

Grawitz ging von der Vorstellung aus, dass man durch allmähliche Gewöhnung nicht pathogener Schimmelpilze an die Existenzbedingungen des thierischen Organismus pathogene Modifikationen erzeugen könnte, und dass man umgekehrt pathogene Formen in unschädliche überführen könnte. Grawitz verfolgte zu diesem Zwecke folgendes Prinzip: Da die Schimmelpilze für gewöhnlich auf säuerlich festen Substraten bei 10—20° C. zu vegetiren pflegen, und da mehrere dieser Bedingungen im thierischen Körper

nicht künstlich hergestellt werden können, so sollten die Pilze durch mehrere Generation hindurch fortgesetzte Züchtung an die ihnen sonst nicht passenden, äusseren Verhältnisse gewöhnt werden. Die Pilze mussten an ein flüssiges, alkalisches, 39° C. warmes Nährmittel akkommodirt werden, und es musste durch systematische Kulturen eine solche Keimschnelligkeit erzielt werden, dass die anfangs stark wuchernden Fäulnisspilze im Kampfe ums Dasein untergingen. Sät man beliebige Schimmelpilze (Penicillium und Eurotium) auf angefeuchtetes Brod aus, und stellt dieses vor Austrocknung geschützt in einem Wärmeschrank bei 38—40° C. an, so entwickeln sich grüne fruktifizirende Schimmeldecken. Die Sporen benutzt man dann zur Aussaat auf Brod, welches in Wasser zu einem dünnen Brei erweicht ist und bei gleicher Temperatur gehalten wird. Nach 2—3 Tagen, in welcher Zeit auch diese Generation reif ist, nimmt man eine schwach saure, sehr dünne Peptonlösung mit Zusatz von ca. 1% Rohrzucker und züchtet hierauf die Pilze weiter. Da es hierbei sehr leicht zu Fäulniss oder Gährung kommt, so kann man im Allgemeinen durch reichlichen Zuckergehalt die Fäulnisspilze, durch stärkeren Säuregehalt und konzentrirtere Lösungen die Gährungsfermente beschränken; es ist jedoch am besten, eine Anzahl Kolben mit Watte verschlossen, gleichzeitig anzustellen, und ev. nur den einzigen, welcher einschlägt, zur Aussaat zu behalten. Wenn die Oberfläche mit einer reinen Schimmelschicht bedeckt ist, so bleibt die Peptonlösung völlig klar, und man kann die nächste Generation auf etwas weniger saurer, die folgende auf neutraler oder schwach alkalischer Peptonlösung mit Rohrzuckerzusatz ziehen. Jede gut gelungene Kultur liefert eine Aussaat, welche schneller keimt und widerstandsfähiger

gegen Bakterien ist, so dass bald keine Fäulniss mehr vorkommt, selbst wenn man zu Eiweiss oder Peptonlösungen Natronlauge bis zur starken, alkalischen Reaktion zusetzt und den Zucker weglässt, ja selbst wenn man frisches Thierblut als Nährmaterial wählt. Das Blut bleibt trotz der hohen Temperatur tagelang ganz geruchlos und wird von einem Mycelium der Fadenpilze überall durchwachsen, das keine Bakterienkeime aufkommen lässt. Sind die Kulturen soweit gediehen, in ca. 1—2 Wochen, so ist der Schimmelpilz in seiner Form, Grösse und Fruktifikation nicht von der ersten Aussaat zu unterscheiden, und doch sind die Formen physiologisch mehr von einander verschieden, als ganz fernstehende Pilzarten. Mit dieser so gefundenen Varietät machte nun Grawitz seine Versuche.

Bei der direkten Injektion ins Blut wurden die Sporen, welche längere Zeit trocken gestanden hatten, in 1% kochsalzhaltigem, warmem Wasser vertheilt, durch ein Tuch koliert und in die Jugularvene eingespritzt. Das am meisten von der mykotischen Infektion betroffene Organ ist die Niere. Bei dieser finden sich zahlreiche, mykotische Heerde, welche sowohl in der albuginea, als auch auf der Oberfläche, in der corticalis und in der Marksubstanz mit blossem Auge erkannt werden. Die Leber zeigt tausende, mikroskopische, tuberkelähnliche Heerdchen, in deren Innern sich regelmässig ein Pilzkeim findet, und in deren Umgebung ein Zerfall der Leberzellen eingetroffen ist.

In der serosa sowohl als in der mucosa des Darmes lassen sich die weissen submiliaren bis miliaren Knötchen leicht unterscheiden. Das nekrotische Centrum des Knotens zerfällt und bildet ein typhusähnliches Geschwür, dessen Ränder dichte Pilzrasen enthalten.

In der Lunge findet man eine Anfüllung der Alveolen

sowie der Alveolenwände mit dichtem Fadengitter ohne ein Exsudat in der Nachbarschaft der Heerde.

Das Muskelgewebe ist ein Prädilektionsort für die Schimmelansiedelung, während die Milz, das Knochenmark, die Lymphdrüsen sowie die Nervenapparate, Retina und Haut nur in ganz untergeordneter Weise an den Prozessen betheiligt sind. Bei der Sporentransfusion in die carotis anstatt in die vena iugularis werden Gehirn und Retina zuerst ergriffen, und erst von da aus gelangen die Sporen durch den Kreislauf in die grossen Drüsen des Unterleibes.

Wenn auch die Wirkung der Schimmelsporen bei indirekter Injektion in die Blutbahn im Prinzip mit den bisher beschriebenen Befunden übereinstimmt, so weicht sie jedoch im Einzelnen wesentlich ab. Die so kleinen Partikel werden sehr bald von den Lymphgefässen der grossen Peritonealfläche aufgenommen, in diesen centripetal weitergeführt und gelangen endlich durch den ductus thoracicus in den Blutkreislauf selbst. Die künstlich zu Parasiten umgewandelten Varietäten der Schimmelpilze keimen nun so schnell, dass sie auf dem oben genannten Wege überall durch ihre Schösslinge am Weiterkommen aufgehalten und in den Lymphbahnen eingekeilt werden. Von hier aus wuchern sie durch die Kanäle in das Bindegewebe hinein und erzeugen tausende miliarer, opaker, weisser Knötchen und perlschnur ähnlicher Stränge, welche am dichtesten im Zwerchfell liegen, aber auch im Netz und den Mesenterien einer Tuberkulose dieser Membranen sehr ähnlich sehen. Nur ein sehr geringer Theil der Sporen erreicht die Venen und verhält sich gerade so, als ob er direkt in dieselben eingespritzt wäre.

Bei Injektionen in das Gewebe ergaben sich folgende Resultate. Bei vorsichtiger Injektion in den Glaskörper

erhielt man allerdings Schimmelmycelien von stattlicher Grösse, jedoch eine sekundäre Irido-Choroiditis ergreift den Bulbus und vernichtet mit demselben auch die Pilze.

Unter der Haut oder zwischen den Muskeln werden die Sporen entweder sofort von den farblosen, kontraktilen Zellen aufgenommen und fortgeführt oder eingekapselt. Bei grösseren Mengen erregen sie heftige Eiterung, im Eiter befinden sich zwar gekeimte Sporen, aber Metastasen scheinen ausgeschlossen zu sein. Die Lungen verhalten sich ganz analog dem subkutanen Gewebe.

Grawitz glaubte nun aus diesen Versuchen folgende Schlüsse ziehen zu dürfen:

1. Die allerbekanntesten und überall verbreiteten Schimmelpilze, Eurotium (Aspergillus) und Penicillium kommen in zwei morphologisch vollkommen übereinstimmenden, physiologisch ganz eminent verschiedenen Varietäten vor, deren eine sich in der Blutbahn höherer Thiere ganz indifferent verhält, deren andere der bösartigsten Gruppe der bisher bekannten, pathogenen Pilze in Rücksicht der Malignität an die Seite zu zetzen ist.

2. Es ist durch das Experiment nachzuweisen, dass aus einer beliebigen Stammform bei fortgesetzter Züchtung beide Varietäten entstehen können, und dass ebenso aus jeder der beiden Spielarten durch systematische Kultur nach etwa 10—20 Generationen die andere erzielt werden kann.

3. Das Prinzip der Züchtung beruht darauf, die auf festen, schwach sauren Nährsubstraten bei einer Temperatur von ca. 8^0—20^0 C. lebenden Pilze durch eine Reihe von Generationen an flüssige, alkalische Eiweisslösungen und eine Wärme von 38—40^0 C. zu gewöhnen.

4. Die Malignität der pathogenen Schimmelpilze besteht in den akuten Fällen darin, dass ihre Sporen, sobald

sie in die Blutbahn höherer Säugethiere gelangen, daselbst keimen, in die verschiedenen Körpergewebe übertreten, in ihnen wuchern, lokale Nekrosen bewirken, und den Tod des Thieres in ca. 3 Tagen herbeiführen. In den subakuten und chronischen Fällen tritt an jedem einzelnen der zahllosen metastatischen Pilzheerde eine reaktive Entzündung auf, welche die Hyphen zum Absterben bringt, und zu einer Heilung führen kann, bei welcher nur die miliaren, fibrösen Knötchen als Kennzeichen der stattgehabten Schimmelinvasion übrig bleiben.

5. Die meist vom blossen Auge leicht erkennbaren Schimmelhäufchen in Nierenkapsel, Nieren, Leber, Muskeln, Retina sind mikroskopisch weder durch die Grösse noch durch anderweite anatomische Merkmale von Pilzen der gleichen Art, die auf beliebigen Nährsubstraten gewachsen sind, zu unterscheiden, mit der Einschränkung, dass sie nur rudimentäre Fruchtträger bilden, und niemals zur Sporenabschnürung gedeihen, selbst dann nicht, wenn man sie in die Bauchhöhle injicirt und gleichzeitig atmosphärische Luft einbläst.“

Grawitz glaubte also, dass man von einer Stammform eine gutartige und eine maligne Varietät züchten könne, und dass man durch systematische Kulturen die maligne in die gutartige oder die gutartige in die maligne Form umwandeln könne.

Alle diese Untersuchungen von Grawitz erregten grosses Interesse und gingen von theoretisch durchaus berechtigten Vorstellungen aus. Indessen zeigte es sich durch die Untersuchungen von Koch, Gaffky, Lichtheim bald, dass die Täuschungen untergelaufen waren, in der Art, dass die Kulturen nicht rein waren, indem mit der Aenderung der Temperatur sich andere Formen ansiedelten

und vorwiegend entwickelten, die von der Form, von der Grawitz ausgegangen war, verschieden waren; dass also nicht das gewöhnliche Penicillium in eine pathogene Modifikation umgezüchtet worden war, sondern dass an seine Stelle ein pathogener Aspergillus getreten war.

Mit diesen Resultaten wurden natürlich die weiteren Versuche von Grawitz, die er zur Erzielung der Immunität mit den seiner Meinung nach schwächeren pathogenen Formen anstellte, hinfällig, wie durch Löffler nachgewiesen wurde.

Weitere Versuche stammen von A. Fraenkel her. In einem Bericht über seinen Vortrag in den Verhandlungen des Vereins für innere Medizin heisst es: (Deutsche med. Wochenschrift 1885 Nr. 31 p. 546).

„Einer der verbreitetsten pathogenen Schimmelpilze, Aspergillus fumigatus, wurde auf Brodkölbchen in Reinkulturen gezüchtet und in fortlaufender Generation immer höheren Temperaturen eines sorgfältig regulirten Thermostaten ausgesetzt. Der Pilz wächst, wie sich hierbei herausstellte, wenngleich sehr verlangsamt, noch bei einer Temperatur von 51—52° C.; verliert aber bei diesen hohen Graden die Fähigkeit zu fruktificiren und bildet auf der Brodoberfläche nur noch eine reine Myceldeke. In diesem sterilen Zustande wurde er bei der genannten Temperatur durch fortdauernde Weiterübertragung ein halbes Jahr gezüchtet. Versetzt man die sterilen Mycelien aus der Temperatur von 51,5° wieder in eine solche von 37° zurück, so beginnen sie in kürzester Zeit zu fruktificiren. Injektionen der Sporen, dieses bei erhöhter Temperatur gezüchteten, später aber behufs Sporenbildung bei 37° verbrachten Aspergillus fumigatus in die Blutbahn von

Kaninchen haben den Tod der Thiere mit eben solcher Sicherheit zur Folge, wie die Einspritzung sporenhaltiger Materialien derjenigen Kulturen, die ausschliesslich bei 37—39° gewachsen waren. Hieraus geht demnach hervor, dass eine Abschwächung der pathogenen Schimmelpilze durch erhöhte Temperatur ohne Weiteres nicht gelingt, wodurch eben bewiesen ist, dass mit der höheren Organisation der pathogenen Pilze auch die Schwierigkeit der biologischen Eigenthümlichkeiten zu modificiren gleichfalls sich vergrössert.

Einen weiteren Schritt in der Untersuchung über die Abschwächung pathogener Schimmelpilze that Ziegenhorn. Die Untersuchungen von Toussaint und Pasteur, dass die pathogene Wirkung des Milzbrandpilzes durch verschiedene physikalische und chemische Einwirkungen vernichtet oder abgeschwächt werden kann, um so durch Schutzimpfung für Milzbrand empfängliche Hausthiere unempfänglich zu machen, brachten Ziegenhorn auf die Untersuchung der Frage, ob diese Eigenschaft der Milzbrandpilze als eine allgemeine Eigenschaft pathogener Pilze angesehen werden dürfe. Trotzdem schon vorher die Abschwächung des Pilzes der Hühnercholera sowie des Schweinerothlaufes und des Rauschbrandpilzes erzielt war, so war es doch noch unerwiesen, ob die beschriebenen Eigenthümlichkeiten jener Pilze allen pathogenen Pilzen zukämen, und diese Frage veranlasste Hagendorn die pathogenen Schimmelpilze auf ihre Abschwächung hin zu prüfen.

Nach Analogie der Abschwächung des Milzbrandkontagiums versuchte er zunächst durch Einwirkung höherer Temperaturen die Malignität pathogener Schimmelpilze abzuschwächen oder zu vernichten, und er glaubte auf diesem Wege am besten ein Resultat zu erreichen bei der Anwen-

dung solcher Temperaturen, welche sehr nahe denen gelegen sind, die das Leben der fraglichen Pilze selbst vernichten. Diese Erwägung führte ihn von vornherein dazu, die Erhitzung der Sporen und Mycelien getrennt zu versuchen. Zunächst setzte er sporenfreie Mycelien aus Organen von Thieren, welche einer Pilzkrankheit erlegen waren, höheren Temperaturgraden aus. Er benutzte für die Versuche Nieren von Thieren, die an einer Infusion mit Sporen von mucor rhizopodiformis erlegen waren, zerlegte dieselben in gleich dicke Scheiben, tauchte sie in erhitztes, sterilisirtes Wasser und säte sie auf sterilisirtes Brod aus. Theils liess er bei diesen Versuchen die Zeit des Eintauchens eine konstante sein, während die Temperatur allmählich erhöht wurde, theils benutzte er Wasser von derselben Temperatur, während die Zeit des Eintauchens anstieg und stellte so verschiedene Reihen her. Diejenigen Glieder der Reihe, welche unmittelbar an den Sterilisationspunkt grenzten, wurden Kaninchen injicirt; die Versuche blieben erfolglos, die Pilze zeigten alle die volle pathogene Wirkung.

Diese ersten Versuche stützten sich auf die Erfahrung, dass die pathogenen Schimmelpilze im Thierkörper keimen und Mycelien treiben, hingegen nicht zur Sporenbildung kommen. Weil jedoch nicht alle Sporen in den Organen erkrankter Thiere zur Keimung kommen, sondern durch mikroskopische Untersuchung ungekeimte Sporen in den Organen zwischen den Mycelien erkannt werden, so brauchten die erhaltenen Kulturen nicht als Abkömmlinge der nahezu bis zur Sterilität erhitzten Mycelien angesehen zu werden, sondern sie konnten von den zufällig vorhandenen ungekeimten Sporen abstammen. Die Versuche mussten desshalb modificirt werden. Er nahm daher bei den folgenden Versuchen nicht eine Temperatur, die derjenigen

nahe liegt, welche die Pilzmycelien tödtet, sondern er liess das Wachsthum der Pilze bei einer Temperatur stattfinden, welche nahe an diejenige grenzt, bei der eine Entwicklung der Pilze nicht mehr stattfindet. Die Anordnung dieser Versuche richtete er nach derjenigen, bei welcher es Pasteur und anderen bereits vorher gelungen war, nicht pathogene Milzbrandgenerationen zu erzeugen.

Es wurden 24 cm lange und 2,5 cm weite Reagensgläser mit Brodinfus gefüllt, sterilisirt und mit Sporen, theils von mucor rhizopodiformis theils von aspergillus fumigatus, inficirt. Die Sporenaussaat wurde durch Schütteln in der Flüssigkeit vertheilt. Die Fruktifikation wird dadurch verhindert, dass man die obere Hälfte der Flüssigkeit vor Bildung der Sporen, solange die Mycelien nur in einem zarten Flaume die Oberfläche bedecken, aufkocht und zwar in den ersten Tagen alle 6—8 Stunden, später alle 12 Stunden und schliesslich mehrere Tage hindurch nur alle 24 Stunden. Nach 2—3 Tagen genügt es schon, die Oberfläche der Kulturen täglich einmal zu erhitzen und nach weiterem Verlauf einiger Tage ist auch dies überflüssig, die oberen Schichten der Flüssigkeit sind steril, während die untere Hälfte von einem zarten Mycelflaum durchsetzt ist. Sodann bringt man die Reagensgläser in einem auf 44,5 ° C. regulirten Thermostaten, der Mycelflaum senkt sich zunächst etwas in der Flüssigkeit und bildet einen dichten Filz, wächst aber alsdann allmählich in die Höhe und zeigt nach mehreren Wochen auf der Oberfläche eine ziemlich dürftige Sporenbildung. Nach dem Eintritte dieses Momentes wurde die oberflächliche Schicht auf der Nährlösung entfernt und eine aus ihr hergestellte Sporenflüssigkeit in Bezug auf ihre pathogene Wirkung geprüft. Auch aus diesen Versuchen resultirte, dass ebensowenig unter diesen Verhältnissen eine

Abschwächung der pathogenen Wirkung der Pilze zu erzielen war wie bei dem ersten Versuche.

Da auch auf diesem Wege keine Abschwächung erreicht worden war, so versuchte Ziegenhorn, ob nicht die Abschwächung der Malignität durch direkte Erhitzung der Sporen zu erlangen sei. Die Sporen einer Reinkultur von mucor rhizopodiformis oder aspergillus fumigatus wurden in sterilisirtem Wasser aufgeschwemmt. Die erhaltene, sehr sporenreiche Flüssigkeit wurde in dünnwandige, 20 cm lange und 8 mm breite Glasröhrchen vertheilt. Die in überhitztem Zustande zugeschmolzenen Glasröhren wurden in die Flüssigkeit getaucht und ihre Spitzen in derselben abgebrochen. Sodann wurden die Röhren, nachdem die Flüssigkeit in ihnen bis zu $^2/_3$ der Höhe angestiegen war, wieder zugeschmolzen. Die mit Sporenflüssigkeit gefüllten Glasröhrchen wurden hierauf in Wasser erhitzt und zwar verweilten entweder alle Glasröhren in der Flüssigkeit bei gleicher Temperatur verschieden lange Zeit, oder die Zeit der Erhitzung blieb dieselbe, während der Grad derselben variirt wurde. Nach vollendeter Erhitzung wurden die Spitzen der Glasröhren wiederum abgebrochen und ein Tropfen ihres Inhaltes auf sterilisirtem Brodbrei ausgesät. Die Röhren wurden dann wieder zugeschmolzen und, um ein Auskeimen der Sporen zu verhindern, in den Eisschrank gestellt, bis durch Beobachtung der bei Körpertemperatur aufbewahrten Aussaaten festgestellt war, welche von den Glasröhren noch lebensfähige Sporen enthielten. Die Aussaaten, welche von den nahezu bis zum Sterilisationspunkte, 67—69° C, erhitzten Flüssigkeiten gemacht wurden, zeigten zwar ein etwas verzögertes Auskeimen, verhielten sich aber sonst wie die normalen. Diese Sporenflüssigkeiten wurden nunmehr auf ihre patho-

gene Wirkung geprüft und ihre Keimfähigkeit und Reinheit durch eine nochmalige Aussaat kontrolirt.

Das Resultat dieser Untersuchungen schien anfangs ein positives zu sein. Es zeigte sich nämlich in allen Versuchen, dass die nahezu bis zum Sterilisationspunkt erhitzten Flüssigkeiten, die unzweifelhaft eine Menge keimbarer Sporen enthielten, beim Kaninchen unwirksam waren. Er fand bei diesen Untersuchungen, dass die dem Sterilisationspunkte sehr nahe gelegene Sporenflüssigkeit nicht pathogen war, dass dagegen die pathogene Wirkung in den abwärts steigenden Gliedern zunehme. Wenn auch unzweifelhaft die Thatsache vorlag, dass keimfähige Sporen pathogener Schimmelpilze dem empfänglichen Thierkörper einverleibt werden konnten, ohne eine Krankheit zu erzeugen, so lag doch eine Abschwächung der Schimmelpilze in dem Sinne der Versuche von Pasteur, Toussaint, Chauveau, Koch etc. nicht vor. Es ergab in der That die Untersuchung der benannten Sporenflüssigkeiten in Plattenkulturen, dass dieselben mit zunehmender Erhitzung immer ärmer an lebensfähigen Sporen werden und so an ihrer pathogenen Wirkung Verlust erleiden. Es ist infolge dessen leicht erklärlich, dass schliesslich ein Punkt kommen muss, bei welchem die Aussaat zwar noch auf Brodbrei zu keimen vermag, jedoch im Thierkörper nicht mehr wirksam ist.

Es beruhte also die scheinbare Abschwächung darauf, dass nur ein kleiner Theil der Sporen lebend blieb, und also nur eine gelindere Infektion herbeiführen konnte, als wenn eine gleich grosse Menge lebender Pilze eingespritzt wurde. Ziegenhorn kam also zu einem völlig negativen Resultat. Da nun Pasteur bei der Abschwächung der pathogenen Wirkungen der Spaltpilze bei den verschie-

denen Arten verschiedene Verfahren einschlug, indem bei der einen höhere Temperaturen wirksam waren, bei anderen Arten das Resultat durch Erschöpfung der Nährflüssigkeiten, wieder anderen durch ihr Durchpassiren durch andere Thierspecies erzielt wurde, so lässt Ziegenhorn die Frage offen, ob es nicht auch durch ein anderes Verfahren, als das von ihm gewählte, gelingen würde, die pathogene Wirkung der Schimmelpilze abzuschwächen oder zu vernichten.

Wie schon früher erwähnt, wurde Herr Prof. Dr. Ribbert durch gelegentliche Beobachtungen bewogen, die Frage einer erneuten Prüfung zu unterziehen. Derselbe berichtete mir darüber Folgendes: „Kulturen von Aspergillus flavescens waren in geschlossenen Gefässen etwa ein Jahr stehen geblieben und erwiesen sich nach dieser Zeit nicht mehr fortpflanzungsfähig. Da es sich um Sporen handelte, die ja sehr widerstandsfähig sind, so konnte es jedenfalls lange gedauert haben, bis sie abgestorben waren, und wahrscheinlich war dieser Zeitpunkt nicht mit einem Male eingetreten, sondern die Abnahme der Entwicklungsfähigkeit der Sporen war allmählich vor sich gegangen. Ich vermuthete nun, dass bei langdauernder Aufbewahrung solcher Kulturen, die dabei völlig eintrockneten, nach einiger Zeit eine Abnahme der Virulenz zu konstatiren sein könnte, vielleicht charakterisirt durch eine langsamere und nur unter den günstigsten Bedingungen noch vor sich gehende Entwicklungsfähigkeit. Eine Probe bestätigte diese Vermuthung. Die mehrere Monate lang aufbewahrten und völlig eingetrockneten Kulturen zeigten folgende Eigenthümlichkeiten. Wurden mit den Sporen derselben auf Agarplatten neue Kulturen angelegt und gleichzeitig frisch gezüchtete Aspergillussporen zur Kontrolle in gleicher Weise

zum Keimen gebracht, so ergab sich bei jenen alten Pilzen eine beträchtliche Wachsthumsverlangsamung. Es dauerte mehrere Stunden länger, bis sich auf der Oberfläche der Agarplatte eine deutliche Entwicklung eines Mycels bei blossem Auge erkennen liess, ebenso währte es viele Stunden länger, bis es zur Fruktifikation kam.

Die mikroskopische Untersuchung zeigte, dass es sich um eine langsamere Sporenbildung handelte, während allerdings auch ein grosser Theil der Sporen sich als abgestorben erwies. Die noch lebenden aber zeigten eine viel geringere Entwicklungsenergie, so dass manche unter ihnen erst zu keimen begannen, als auf der Kontrollplatte schon alle längst gesprosst waren und ein dichtes Mycel bildeten.

Dieser Verlangsamung der Entwicklung der Pilze stand zur Seite eine verminderte Virulenz. Kaninchen, die mit eben den gleichen Mengen von Sporen, wie sie zur Kontrolle von frisch gezüchteten virulenten Kulturen genommen den Tod der Thiere regelmässig zur Folge hatten, geimpft waren, zeigten überhaupt keine Krankheitserscheinungen oder gingen erst nach viel längerer Zeit als jene zu Grunde. Erst wenn man mehrere Kubikcentimeter einer deutlich trüben Emulsion anwandte, erkrankten und starben die Kaninchen, aber auch dann erst nach einer um mehrere Tage längerer Krankheitsdauer. Die mikroskopische Untersuchung stellte fest, dass die Entwicklung der Sporen vor Allem in den Nieren, die ja das günstigste Organ für die pathogenen Schimmelpilze darstellen, deutlich geringer war als in den Nieren der mit virulentem Material infizicirten und schon wenige Tage nach der Einspritzung zu Grunde gegangener Thiere.

Es konnte demnach kein Zweifel sein, dass die bei den Kulturen ausserhalb des Körpers beobachtete vermin-

derte Wachsthumsenergie sich im Körper als verminderte Virulenz geltend gemacht hatte."

Diese Verhältnisse im Einzelnen zu prüfen war die mir gestellte Aufgabe.

Ich verfuhr so, dass ich nach Anfertigung von Agarplatten auf ihre Oberfläche eine mässige Menge von Sporen ausstreute und zwar nebeneinander auf eine Platte Sporen des virulenten Aspergillus flavescens und auf eine andere solche des mehrere Monate hindurch trocken aufbewahrten. Die Untersuchung wurde dann im Laufe der nächsten 24 Stunden in Intervallen vorgenommen, in der Weise, dass ein Stückchen eines Deckglases auf eine kleine Stelle der Platte aufgelegt nnd diese bedeckte Parthie mikroskopisch untersucht wurde. Dann brachte ich die Platten in den Brütofen zurück und wartete wieder einige Stunden.

Die erste Untersuchung wurde nach 4 Stunden vorgenommen und ergab Folgendes:

Bei der abgeschwächten Art ist noch fast keine Veränderung eingetreten. Nur sehr wenige Sporen haben in ihrem Umfange in konzentrischen Kreisen nach aussen hin zugenommen, aber es sind nur sehr geringe Unterschiede von der ursprünglichen gelben Farbe der Sporen vorhanden. Schösslinge zeigen sich noch an keiner Stelle.

Bei der virulenten Art sind schon viele Sporen deutlich vergrössert, manche haben sogar schon kleine zapfenförmige Ausläufer angesetzt.

Nach 8 Stunden:

Ungefähr $^5/_7$ der Sporen der abgeschwächten Art waren noch unverändert, während die übrigen Sporen zum grösseren Theil sich kreisförmig erweitert hatten und die ursprüngliche gelbe Farbe in ein wasserhelles Aussehen verwandelt hatten. Ein geringerer Theil der Sporen hatte Sprossen

ausgesendet und sich schlauch- oder kolbenförmig ausgedehnt; jedoch waren die Schösslinge nicht grösser, als die 5—6-fache Verlängerung des Durchmessers der Aussaat-Sporen. Virulente Art: Alle Sporen waren gekeimt, die meisten hatten lange Schläuche ausgesandt, welche über die Grenzen des Gesichtsfeldes hinübergingen. Das ganze Gesichtsfeld zeigte solche in grosser Menge kreuzweise durcheinanderlaufender Schläuche.

Nach 12 Stunden:

Bei der virulenten Art ist ein deutlich makroskopisch sichtbarer Belag zu bemerken.

Abgeschwächte Art: Kaum der dritte Theil der vorher noch unentwickelten Sporen ist unverändert geblieben. Die übrigen sind theils gequollen, theils haben sie schon kleine Fortsätze angesetzt. Die früher schon weiter entwickelten Sporen haben schon schlauchförmige Sprösslinge ausgesandt, während die Sporen, welche am weitesten fortgeschritten waren, sich schlauchförmig schon so weit erweitert haben, dass sie das Gesichtsfeld überschreiten, und zwar liegen die Fortsätze so, dass sich dieselben kreuzen und durchschneiden. Makroskopisch ist auf dem Präparate nur eine ganz minimale Trübung zu entdecken.

Nach 18 Stunden:

Abgeschwächte Art: Noch sind einzelne im Gesichtsfelde zerstreut liegende unveränderte Sporen zu erkennen. Die meisten Sporen haben gekeimt und senden Schläuche aus, welche in buntem Gewirre das Gesichtsfeld ausfüllen. Makroskopisch ist ein deutlicher grau-weisslicher Beschlag der Gelatinplatte zu erkennen.

Nach 30 Stunden:

Bei der virulenten Kultur reichliche gelbe Fruktifikation.

Bei der andern ein dichter weisser Rasen ohne deutliche Fruktifikation.

Nach 48 Stunden:

Auf beiden Kulturen gelbe Fruktifikation, aber auf der des virulenten Pilzes ist die Fruktifikation bedeutend dichter als auf der andern.

Es wäre denkbar gewesen, dass mit der Anfertigung der ersten Kultur des abgeschwächten Pilzes diese geringere Wachsthumsfähigkeit sich verloren hätte, dass also die bei dieser Kultur entstandenen Sporen ebenso rasch keimen würden, als frisch gezüchtete. Es würde das also bedeutet haben, dass nur die Sporen durch die Eintrocknung gelitten hätten, dass aber die daraus hervorgegangenen Pilze wieder völlig wachsthumsfähig geworden wären. Weitere Versuche lehrten aber, dass die Abnahme der Wachsthumsgeschwindigkeit auch in den weitern Generationen sich geltend machte. Stets wuchsen aus den angelegten Kulturen die Pilze langsamer als aus zur Kontrolle mit virulentem aspergillus angelegten Kulturen. Es ist also so zum mindestens über mehrere Generationen sich erstreckende geringere Wachsthumsfähigkeit erzielt worden.

Es fragt sich nun, ob wir berechtigt sind in diesen geschilderten Erscheinungen eine Abschwächung zu erblicken, d. h. also, ob diese Pilze für den Organismus als weniger virulent angesehen werden können. Wenn schon uns die einfache Ueberlegung sagt, dass ausserhalb des Körpers langsamer wachsende Pilze wahrscheinlich auch in ihm weniger schnell wachsen können, und dadurch natürlich auch weniger akute Erscheinungen machen müssen, so geht auch aus neuerdings von Smirnow unter Flügge's Leitung angestellten Untersuchungen hervor, dass auch die

Abschwächung von Bakterien sich in erster Linie äussert durch eine verminderte Wachsthumsfähigkeit. Ich gebe hier kurz eine Uebersicht über seine Versuche.

Da bei den früheren Versuchen über die Abschwächung pathogener Bakterien die Frage nach dem innern Vorgang bei der Abschwächung, nach den Aenderungen, welche im biologischen Verhalten der Spaltpilze durch die Abschwächung hervorgebracht werden, nur flüchtig gestreift wurden, so versuchte Smirnow in dieses Dunkel Licht zu bringen. Alle Agentien, durch welche eine Abschwächung pathogener Bakterien erreicht wurde, besitzen die Eigenschaft, die Bakterien, welche sie in mässigem Grade angewandt abschwächen, bei forcirter Anwendung zu tödten. Es muss also wohl unter dem Einflusse dieser Agentien eine direkte Schädigung und eine Degeneration der Bakterien stattfinden, während eine Rassen- oder Varietätenbildung durch Anpassung bei der grossen Menge der in gleicher Weise wirksamen schädigenden Momente nicht denkbar ist. Smirnow wirft nun die Frage auf: Aeussert sich die Degeneration der pathogenen Bakterien nur in einem Verlust einer einzelnen Eigenschaft, der Virulenz, oder betrifft dieselbe die gesammte Lebens- und Wachsthumsenergie?

Da viele der Einflüsse, welche bei mässiger Einwirkung nur die Virulenz vernichten, bei geringer Steigerung die Bakterien tödten, so kann daraus der Schluss gezogen werden, dass ein Verlust der Virulenz nur stattfinden kann, wenn zugleich die Energie der gesammten Lebensfunktionen des Baccillus herabgesetzt wird. Es scheint somit nur die Annahme, dass es sich bei der Abschwächung um eine allgemeine Degeneration der virulenten Bakterien handelt, um eine Herabsetzung des ganzen Stoffwechsels

und der gesammten Wachsthums- und Lebensenergie mit der Thatsache zu harmoniren, dass wesentlich schädigende Momente die Abschwächung zu Wege bringen. Die allgemeine Abnahme der Lebensenergie müsste sich dann dadurch äussern, dass die abgeschwächten Bakterien auch ausserhalb des Thierkörpers langsamer und schwieriger wachsen und sich vermehren, als die virulenten. Ebenso müssen gegenüber schädlichen von aussen ankommenden Einflüssen die in ihrer Energie herabgesetzten Bakterien weniger Widerstand leisten, als die virulenten lebenskräftigen Krankheitserreger.

Da nun die auffallende Wachsthumsverlangsamung der abgeschwächten Bakterien von früheren Beobachtern übergangen oder falsch gedeutet war, so suchte Smirnow durch Experimente zu ermitteln, ob die geschwächten Bakterien eine geringere Proliferationsenergie besitzen als die virulenten und ob die Vaccinsschädigenden Momenten gegenüber weniger resistent sind als die Erreger. Seine Untersuchungen stellte er an an Milzbrand, Schweinerothlauf und Hühnercholera.

Bei der Herstellung der abgeschwächten Kulturen wandte Smirnow zuerst die Toussaint-Chauveau'sche Methode der kurz dauernden Erwärmung an und legte von der ersten erwärmten Aufschwemmung Kulturen an. Da es aber sehr vieler Mühe und vieler Versuche bedarf, um auf diesem Wege feine Abstufungen in dem Grade der Abschwächung zu erlangen, so benutzte er nachher ausschliesslich die Methode von Pasteur, welche auf lange dauernder Erwärmung auf 42,4° C. beruht. Auf diese Weise erhielt er drei gut unterscheidbare Virulenzstufen, deren Abschwächungsgrad parallel der Dauer der Erwärmung immer stärker wurde und suchte

an diesen die Natur der Abschwächung festzustellen. Nachdem Smirnow sich noch durch Vermittlung Pasteurs und anderer in den Besitz von genügend abgeschwächten Kulturen von Milzbrand, Schweinerothlauf und Hühnercholera gesetzt hatte, prüfte er die Proliferationsenergie der abgeschwächten Bakterien im Vergleich zu derjenigen der virulenten qualitativ und womöglich quantitativ.

Schon oberflächliche Beobachtungen weisen darauf hin, dass die abgeschwächten Bakterien langsamer wachsen als die virulenten. Wenn man drei Erlenmeyer'sche Kölbchen mit virulentem Milzbrand und mit Pasteur'schem 1. und 2. Vaccin impft und 24 Stunden bei 35° C. stehen lässt, so ist bei dem mit virulentem Milzbrand geimpften Kolben der Boden mit groben Flocken dicht bedeckt, bei dem mit Vaccin II besäten Kolben ist die Schicht weniger dicht und wird aus viel kleineren Flocken gebildet, und in dem Kölbchen mit Vaccin I hat sich nur ein ganz leichter, dünner weisslicher Bodensatz fast ohne Andeutung von Flockenbildung abgesetzt.

Auch in Stichkulturen in zehnprozentiger Nährgelatine und auf schräger Agar-Agarfläche ist die Wachsthumsverzögerung des abgeschwächten Milzbrandes ungemein deutlich. Niemals erscheinen so grosse Ausbreitungen, wie sie die virulente Art in kürzester Zeit hervorbringt.

Um zu exakteren quantitativen Vergleichen zu gelangen, wurde versucht, durch Bestimmung der Vermehrungsgeschwindigkeit der einzelnen Bakterien die verminderte Proliferationsenergie der abgeschwächten Baccillen nachzuweisen. Zunächst stellte er die Resultate der verschiedenen Versuche tabellarisch dar, und fand aus den verschiedenen Zahlen jedes einzelnen Versuchs, dass die Vaccins sich erheblich langsamer vermehren als die viru-

lenten Baccillen, und dass die letzteren die am stärksten abgeschwächten Vaccins im Mittel um das doppelte bis Vierfache an Wachsthumsenergie übertreffen.

Hierauf nahm er das verzögerte Wachsthum der abgeschwächten Bakterien auf Platten als Massstab für die Wachsthumsenergie. Wenn man Gelatineplatten, auf denen die gleiche Anzahl von Keimen der verschiedenen Virulenzstufen ausgesät ist, unter den gleichen Bedingungen hält und für alle nach derselben Zeit die Grösse der gewachsenen Kolonien bestimmt, so ist offenbar derjenige Baccillus am schnellsten gewachsen, dessen Kolonien den grössten Durchmesser zeigen. Er fand z. B., dass nach derselben Wachsthumszeit der Durchmesser der Kolonien des 16—18 Tage abgeschwächten Milzbrandes zweimal, der des 35 Tage abgeschwächten viermal so klein ist, als der Durchmesser der virulenten Kolonien. In ebenso überzeugender Weise liess sich beim Schweinerothlauf die Wachsthumsverlangsamung der abgeschwächten Baccillen darthun.

Bei den Versuchen über die Resistenz der virulenten und abgeschwächten Baccillen gegen schädigende Momente prüfte Smirnow nur die Wirkung der Karbolsäure und der Salzsäure. Nach zwei Richtungen hin wurde die Einwirkung beider Substanzen geprüft. Einmal wurde die Menge bestimmt, welche man einem Nährboden zufügen muss, um das Wachsthum der Bakterien auf demselben zu hindern, das andere Mal wurde festgestellt, wie lange man eine Lösung von bestimmter Konzentration auf die Bakterien oder deren Sporen einwirken lassen muss, um ihre Entwicklungsfähigkeit für immer aufzuheben. Nachdem er seine einzelnen Experimente tabellarisch zusammengestellt hatte, fand er bei diesen Versuchen, dass im Allgemeinen die Empfindlichkeit gegen die

Desinfectionsmittel sich steigert proportional dem Grade der Abschwächung.

Durch alle diese Versuche fand nun Smirnow seine im Eingange ausgesprochene Vermuthung bestätigt, dass es sich bei der Abschwächung nicht bloss um den Verlust einer einzigen spezifischen Eigenschaft, sondern um eine wirkliche, allgemeine Degeneration der Baccillen handelt, und dass diese in einer verminderten Wachsthumsenergie und in einer grösseren Empfindlichkeit gegen schädigende Einflüsse ihren Ausdruck findet. Demnach dürfe man auch annehmen, dass die Fähigkeit der hier untersuchten, pathogenen Bakterien im Körper zu wachsen, keineswegs eine von den übrigen Lebensfunktionen unabhängige Eigenschaft derselben darstellt, die man ihnen nach Belieben nehmen kann, ohne ihr übriges Verhalten zu alteriren, sondern dass die Virulenz zugleich mit der höchsten Lebens- und Widerstandskraft dieser pathogenen Mikroorganismen einhergeht. Ferner zieht Smirnow den Schluss, dass man durch diese Versuche zu dem Resultat gelangt sei, den Grad der Abschwächung durch die Schnelligkeit des Wachsthums und durch die Resistenz gegen schädigende Momente genauer als bisher möglich zu bestimmen.

Wenn so die Untersuchungen von Smirnow zeigen, dass die Abschwächung der Bakterien sich wesentlich äusserst in einer Wachsthumsverlangsamung derselben, so dürfen wir die von uns konstatirte durch mehrere Generationen verfolgte sehr ausgesprochene Verminderung der Wachsthumsenergie gleichfalls als Abschwächung auffassen; es ist ja auch zu erwarten, dass die pathogenen Organismen, die ausserhalb des Körpers in den für sie günstigeren Lebensbedingungen langsamer gedeihen, auch im Körper, in welchem sie ungünstigere Existenzverhältnisse antreffen,

weniger gut fortkommen werden. Je langsamer aber ein Pilz im Körper wächst, desto weniger gefährlich wird er für denselben werden. Es kam nun natürlich darauf an, durch Thierversuche diese Voraussetzung zu bestätigen.

Nun ist es allerdings schwierig zu sicheren Vergleichen zwischen der Wirkung virulenter und der Wirkung abgeschwächter Aspergillen zu gelangen, weil es zur Gewinnung sicherer Resultate nöthig wäre, die gleichen Mengen völlig lebensfähiger Keime zu injiciren. Indessen konnte es hier auf absolute Genauigkeit überhaupt nicht ankommen. Wir stellten eine Reihe von Versuchen in folgender Weise an:

Es wurden einige Kontrollthiere mit dünnen kaum getrübten Emulsionen virulenter Kulturen inficirt und gleichzeitig wurde andern Thieren die gleiche Menge einer sehr deutlich getrübten Aufschwemmung der abgeschwächten Pilzsporen injicirt. Wenn auch unter letzteren ein grosser Theil von Keimen sich befindet, die nicht mehr als lebensfähig angesehen werden können, so war doch ihre Gesammtmenge so gross, dass die Zahl der entwicklungsfähigen Sporen sicherlich grösser war als die Zahl der Keime in den virulenten Aufschwemmungen. Die Resultate waren nun überzeugend. Zwar handelt es sich nicht darum, dass etwa die entwicklungsfähigen Sporen des abgeschwächten Aspergillus im Körper gar nicht ausgekeimt werden, vielmehr trat auch hier eine Sprossung in allen Organen ein, aber die infolge dessen entstehende Erkrankung war weniger intensiv. Die Thiere lebten viel länger als bei der Infektion mit virulenten Aspergillen und bei Infektion mit geringen Mengen blieben viel mehr Thiere am Leben. — So lebte z. B. ein grosses Kaninchen, welchem drei Spritzen einer sehr trüben Emulsion intravenös injicirt worden waren, 14 Tage lang, ging allerdings dann schliesslich doch an den Nierenprozessen, an einer Verkäsung der Markkegel zu Grunde.

Mit der gleichen Menge virulenter Sporen inficirte Thiere würden schon nach 3 höchstens 4 Tagen zu Grunde gegangen sein. Aehnlich lagen die Resultate bei andern Versuchen.

Es handelt sich also offenbar um eine starke Verlangsamung der entzündlichen Heerdprozesse und darum, dass im Verlaufe der allmählichen Erkrankung der Körper Zeit gewann, seinen ihm zu Gebote stehenden Einfluss auf die Vernichtung der pathogenen Keime besser als bei den virulenten Sporen geltend zu machen.

Somit ist es also durch Kultur und Thierversuche festgestellt, dass es gelingt auch pathogene Schimmelpilze, die man bisher nach dieser Richtung hin vergebens geprüft hatte, abzuschwächen. Welchem Einfluss nun zwar diese Abnahme der Virulenz zuzuschreiben ist, geht aus unseren Mittheilungen nicht ohne Weiteres hervor. Wir sahen, dass die Abschwächung erreicht war durch monatelanges Stehenlassen der Kulturen in geschlossenen Gläsern. Ob es sich hier nun lediglich um den Einfluss der Eintrocknung handelt, oder ob überhaupt einfach durch das längere Liegen der Sporen die Lebensprozesse in ihnen herabgesetzt werden, ist nicht ohne Weiteres klar. Es wird weiterer Untersuchungen bedürfen, um das festzustellen. Die Thatsache selbst aber ist zweifellos.

Es kann nun schliesslich noch angeführt werden, dass, wie nicht anders zu erwarten, die Infektion mit den abgeschwächten Aspergillen sich auch eignet den Einfluss einer einmaligen auf eine zweite Infektion in dem von Ribbert in seiner Monographie: »Ueber den Untergang pathogener Schimmelpilze im Körper« und in der gleichzeitig mit dieser erscheinenden Dissertation von Nippen über dasselbe Thema dargelegten Sinne zu beweisen.

Vita.

Geboren wurde ich, Otto Hügemeyer, ev. Confession, als Sohn des Lehrers Gustav Hügemeyer und der Lina, geborene Eichelkamp, zu Pöppinghausen im Kreise Bochum am 9. September 1863. Nach erhaltenem Elementarunterricht bezog ich die höhere evangelische Bürgerschule in M.-Gladbach, welcher ich bis zur Sekunda angehörte, um dann meine Studien auf dem neuerrichteten Gymnasium fortzusetzen. Das Abiturientenexamen bestand ich Ostern 1884 an letztgenannter Anstalt und begab mich von dort im Sommersemester 1884 nach Bonn, um mich dem Studium der Medizin zu widmen. Ostern 1886 bestand ich in Bonn mein tentamen physicum und genügte darauf meiner Militärpflicht vom 1. April bis 1. October 1886 beim 3. Bat. 5. Königl. Bayr. Inf.-Regiments „Grossherzog von Hessen" in Erlangen, allwo ich mich nach beendeter Dienstzeit noch 2 Semester lang aufhielt.

Herbst 1887 nach Bonn zurückgekehrt, bestand ich daselbst am 1. August 1888 das Examen rigorosum.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren und Docenten:

In Bonn: Barfurth, Binz, Clausius, Doutrelepont, Finkler, A. Kekulé, Koester, Kocks, von Leydig, Nussbaum, Pflüger, Prior, Ribbert, Rühle, Saemisch, Schaaffhausen, Strasburger, Trendelenburg, Ungar, von La Valette St. George, Veit, Walb, Witzel;

in Erlangen: Fleischer, Frommel, Graser, Heineke, Penzold, Strümpell, Zenker, Zweifel.

Allen diesen hochverehrten Herren spreche ich hiermit meinen besten Dank aus. Besonders ist es mir eine angenehme Pflicht, an dieser Stelle Herrn Professor Dr. Ribbert für seine mir bei Anfertigung dieser Arbeit durch Rath und That bewiesene, gütigt geleistete Hilfe bestens zu danken.

Thesen.

1. Die Hasenscharten-Operation ist am besten unmittelbar nach der Geburt vorzunehmen.
2. Bei Placenta praevia centralis ist sobald wie möglich die centrale Durchbohrung des Mutterkuchens und die kombinirte Wendung auf einen Fuss allen andern Methoden vorzuziehen.
3. Innerlich gegebene Adstringentien sind bei Blasenblutungen der Lokalbehandlung vorzuziehen.